

Fig. 1. Microscopic examination of liver (Sudan III staining): (A) case 1, (B) case 2, (C) case 3, and (D) case 11. Diffuse and distinctive Sudan III-positive vacuoles were detected in case 1 (A) and moderate Sudan III-positive vacuoles were detected in cases 2 and 3 (B, C). No Sudan III-positive vacuoles were detected in the other cases, for example case 11 (D).

In case 3, although moderate steatosis existed on histological examination, the data did not suggest specific disease.

4.3. Mutational analysis in cases 1 and 2

In case 1, no disease-causing or novel mutation was found in the *CACT* gene, although two homozygous substitutions (c.1055T>G and

c.1102G>A) and two heterozygous substitutions (c.1148T>A and c.1931T>C) were found in the *CPT 2* gene (Table 3). The two homozygous substitutions result in phenylalanine to cysteine substitution at position 352 (p.F352C) and valine to isoleucine substitution at position 368 (p.V368I). These two substitutions are common genetic polymorphisms [19–22]. The two heterozygous substitutions result in phenylalanine to tyrosine substitution at position 383 (p.F383Y) and leucine to serine substitution at position 644 (p.L644S) (Table 3). The c.1148T>A substitution is a disease-causing mutation [20–23]. The c.1931T>C substitution, which has not been reported previously, was

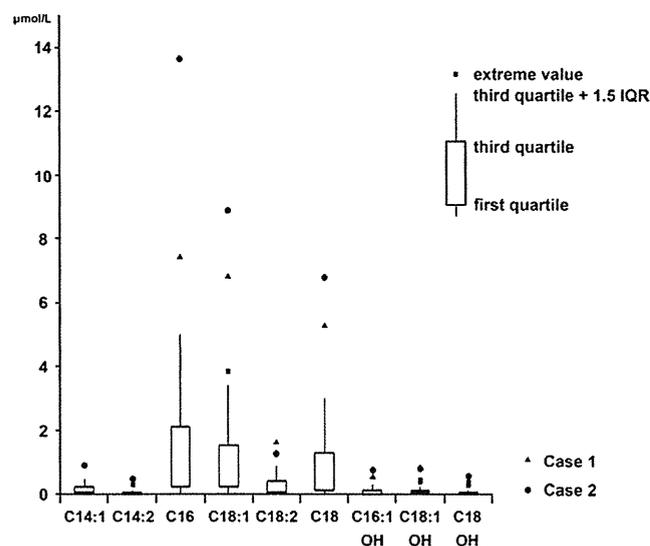


Fig. 2. Box plot of long-chain acylcarnitine profiles. In almost all cases the data were within the third quartile + 1.5 of the interquartile range (IQR), whereas the long-chain acylcarnitines in cases 1 and 2 were distinctly increased. The upper edge of the square indicates the third quartile and the lower edge of the square indicates the first quartile. The upper limit of the line is the third quartile + 1.5 IQR.

Table 3
Identified base substitutions of cases 1 and 2.

Gene	Location	Substitution	Amino acid	Haplotype	
Case 1 <i>CPT 2</i>	exon4	c.1055T>G*	F352C	Homo	
	exon4	c.1102G>A*	V368I	Homo	
	exon4	c.1148T>A	F383Y	Hetero	
	exon5	c.1931T>C	L644S	Hetero	
Case 2	<i>CPT 2</i>	exon4	c.1055T>G*	F352C	Hetero
		exon4	c.1102G>A*	V368I	Homo
	<i>ACADVL</i>	exon2	c.128G>A*	G43D	Hetero
	<i>HADHA</i>	IVS1	+ 51G>T*		Hetero
		exon6	c.474C>T*	Y122Y	Hetero
	<i>HADHB</i>	IVS6	+ 26G>C*		Hetero
		Exon2	c.6-7insACT*	T2-3ins	Hetero
		IVS8	- 50C>A*		Hetero
		exon10	c.825T>C*	V242V	Hetero
		IVS11	+ 66A>G*		Hetero
		IVS13	+ 4A>T*		Hetero
IVS13		- 27T>C*		Hetero	

* These substitutions have been already reported as a polymorphism or were detected in control subjects in this study.

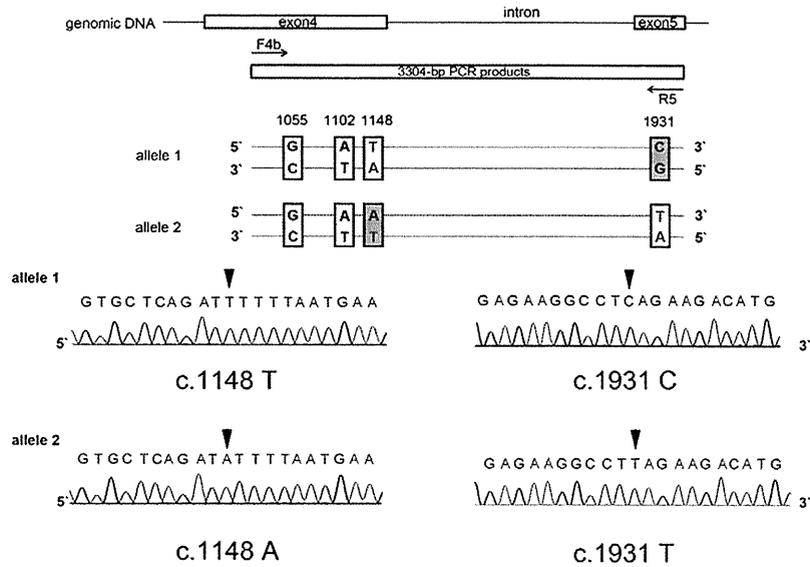


Fig. 3. Haplotype analysis of case 1. Sequence analysis of the 3304-bp PCR products revealed two types of sequencing patterns: c.1148T–c.1931C was on allele 1 and c.1148A–c.1931T was on allele 2.

not detected in 100 chromosomes of healthy control subjects (data not shown). This indicated that this substitution was not a polymorphism. Concerning the haplotype of this patient, sequence analysis of the 3304-bp PCR products that included a pair of heterozygous substitutions (c.1148T>A and c.1931T>C) revealed two types of sequencing patterns: c.1148T–c.1931C was on allele 1 and c.1148A–c.1931T was on allele 2 (Fig. 3). These data indicate that the patient had a compound heterozygote for the c.1148T>A mutation and the c.1931T>C mutation.

In case 2, some substitutions existed in exons and their flanking intronic regions of each gene, but all substitutions have been already reported as a polymorphism or were detected in control subjects in this study (Table 3).

4.4. Acylcarnitine analysis of newborn screening card of case 1

The acylcarnitine profiles of the newborn screening card of case 1 showed increases in long-chain acylcarnitines such as C18:1, C18:2, and C18 (Fig. 4). The ratio of C18:1 + C16 to C2 was 1.56, suggestive of CPT II deficiency or CACT deficiency.

5. Discussion

In the present study we retrospectively reviewed 30 Japanese SUDI cases and found two cases of long-chain fatty acid oxidation defects. Molecular analysis revealed that the one patient had a compound

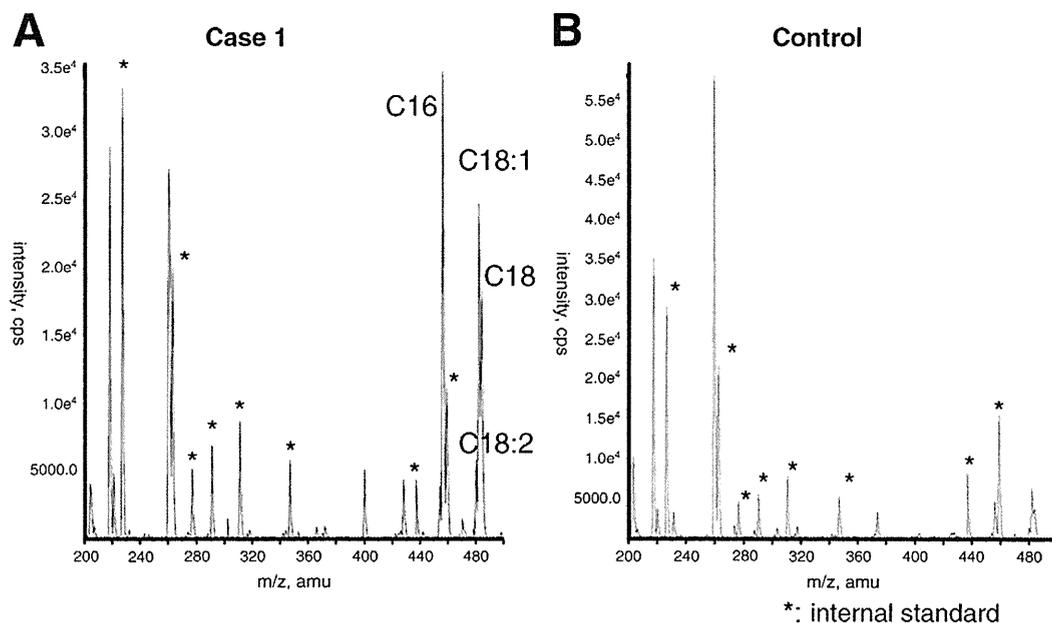


Fig. 4. The acylcarnitine profiles of newborn screening card of case 1. The acylcarnitine profiles showed increases in long-chain acylcarnitines such as C18:1, C18:2, and C18.

heterozygote for a novel mutation (p.L644S) and a disease-causing mutation (p.F383Y) in the *CPT 2* gene. Furthermore, retrospective acylcarnitine analysis of the newborn screening card of this patient was consistent with CPT II deficiency.

5.1. Fibroblasts should be cultured for enzyme analysis

For making a definite diagnosis such as FAODs, enzyme analyses of fibroblasts, leukocytes, liver, or muscle are needed. These samples should be obtained immediately after death to avoid postmortem changes [24]. However, autopsies are not always performed immediately after death so accurate diagnosis is difficult. On the other hand, culturing of fibroblasts is still possible on the fourth day postmortem [4]. It would therefore be beneficial to culture fibroblasts in the future.

Consequently, we performed histological examinations of liver and blood acylcarnitine analyses for screening SUDI cases in the present study. In place of enzyme analysis, genomic DNA analysis was performed to make a definite diagnosis.

5.2. Hepatic steatosis was found in 10% of SUDI cases

In the present study, three of 30 cases were associated with hepatic steatosis. According to a previous SUDI report, 16 (7.3%) of 220 SUDI cases had hepatic steatosis [25]. In the Japanese population, 13.5% had hepatic steatosis [26]. These proportions are consistent with the present study.

5.3. Blood acylcarnitine analysis was useful for detecting FAODs

In most of the postmortem samples, free carnitine and short-chain acylcarnitines were increased and long-chain acylcarnitines were not increased compared with the normal range for premortem samples (Supplementary data). Although these data suggested CPT I deficiency, they might partly be due to postmortem changes, as tandem mass spectra from postmortem blood samples are predominantly characterized by increases in free carnitine and short-chain acylcarnitines [6]. It is difficult to distinguish whether these results were due to postmortem changes or other FAODs.

The acylcarnitine profiles in cases 1 and 2 showed increases in long-chain acylcarnitines (Fig. 2), suggestive of long-chain fatty acid oxidation defects. CPT II deficiency, CACT deficiency, very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency, LCHAD deficiency, and MTP deficiency are known to show long-chain fatty acid oxidation defects.

To distinguish CPT II deficiency and CACT deficiency from VLCAD deficiency, the ratio of C16 to C14:1 was used. The ratio was based on the finding that C14:1 is characteristically increased in VLCAD deficiency but not typically in CPT II deficiency and CACT deficiency. The median value of C16/C14:1 for CPT II deficiency and CACT deficiency was 46, whereas that for VLCAD deficiency was 5.7 [6]. In LCHAD deficiency and MTP deficiency, the median value of C16/C14:1 was 5.2. Furthermore, the acylcarnitine profiles may show increases not only in C16, C18:1, C18:2, and C18 but also in long-chain hydroxyacylcarnitines (C16OH, C18:1OH, and C18OH) [6].

In case 1, long-chain acylcarnitines such as C16, C18:1, C18:2, and C18 were increased, but C14:1 was not increased. The ratio of C16 to C14:1 was as high as 49.4. These data suggest that the patient had CPT II deficiency or CACT deficiency. In case 2, not only C16, C18:1, C18:2, and C18 but also C14:1 and C14:2 were increased. The ratio of C16 to C14:1 was 16.25. Long-chain hydroxyacylcarnitines such as C16:OH, C18:1OH, and C18:2OH were also increased. These data suggest that the patient had LCHAD deficiency or MTP deficiency.

In case 3, although steatosis existed on histological examination, the data did not suggest specific disease. Fatty infiltrations are shown with ethanol intoxication, drugs such as valproic acid, infection, autoimmune hepatitis, total parenteral nutrition, type 1 diabetes

mellitus, and nutritional deficiency, as well as inherited metabolic disorders [27]. Further investigations are needed in this case.

5.4. A novel mutation was found in *CPT 2* gene with disease-causing mutation in a compound heterozygote in case 1

In case 1, no mutation was found in the *CACT* gene. However, two heterozygous mutations were found in the *CPT 2* gene (Table 3). Since CPT II deficiency was first described in 1973 [15], many case reports have been published. More than 70 disease-causing mutations have been reported [19,20,22,28–53], including mutations predominant in Japanese [20–23]. The p.F352C substitution is a common sequencing polymorphism in Japan [21,22], while the p.V368I substitution was also reported to be a sequencing polymorphism that occurred in a normal Southern European population with an allelic frequency of 0.51 [19]. These two polymorphisms do not seem to have any effect on CPT II activity [19,21]. The p.F383Y substitution has previously been reported to be a disease-causing mutation [20], although there are no reports in the literature on the p.L644S substitution. The crystal structure of CPT II revealed that the L644 residue is located in α -helix 20 [48,54], so that this amino acid substitution may change the structure of the c-terminal region. Haplotype analysis revealed that these two heterozygous substitutions are not located on the same allele but formed a compound heterozygote (Fig. 3). These findings suggest that the patient had CPT II deficiency with a compound heterozygote for a novel mutation (p.L644S) and a disease-causing mutation (p.F383Y).

In case 2, several substitutions existed, all of which may be polymorphisms. In the present study we amplified only exonic regions with their respective flanking intronic regions. Therefore, a heterozygous large deletion, disease-causing mRNA variants, or promoter activities were not identified. Indeed, in the *HADHB* gene, a case has been reported where intronic exonization was caused by deep intronic mutation and caused MTP deficiency [55]. Further investigation is needed to identify the cause of long-chain fatty acid oxidation defect in this patient.

5.5. Expanded newborn screening may prevent sudden death

Postmortem metabolic screening and molecular analysis enabled us to identify one case of CPT II deficiency, which would have been difficult to diagnose with conventional autopsy. Although metabolic autopsy is standard in some countries [56], it is not yet prevalent in Japan.

Regarding premortem screening in Japan, dried blood of newborn screening cards are used for the detection of the following diseases: phenylketonuria, maple syrup urine disease, homocystinuria, galactosemia, congenital adrenal hyperplasia, and congenital hypothyroidism. Expanded newborn screening for FAODs, amino acidopathies, and organic acidemias is only performed in restricted regions in Japan as a pilot study [57]. The region where the patient with CPT II deficiency was born was not included in this pilot study and premortem screening for FAODs was not performed. We obtained the newborn screening card of this patient and performed acylcarnitine analysis. As we predicted, long-chain acylcarnitines such as C18:1, C18:2, and C18 were increased and the ratio of C18:1 + C16 to C2 was also increased, consistent with CPT II deficiency or CACT deficiency (Fig. 4).

Some FAODs are treatable; CPT II deficiency also can be treated by avoiding fasting and supplying glucose or carnitine [8–10]. Therefore, if premortem screening had been performed, he could have been diagnosed with FAODs, he might have been successfully treated, and sudden death might have been prevented.

In conclusion, metabolic autopsy and expanded newborn screening would be helpful for forensic scientists and pediatricians to diagnose FAODs and prevent SUDI.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ymgme.2010.12.004.

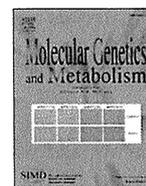
Acknowledgments

We would like to thank Nobuaki Shikata, Kosho Takasu, and Chiemi Tarumi for their helpful advice on pathology, and Yoshiaki Ogura, Kaori Mochizuki, and Ritsuko Asai for their technical advice. This study was partly supported by a grant from The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (200923015A to R.M. and S.Y.), and grants from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (22390208 and 22659195 to S.Y., and 21790990 to H.K.).

References

- [1] A. Cote, P. Russo, J. Michaud, Sudden unexpected deaths in infancy: what are the causes? *J. Pediatr.* 135 (1999) 437–443.
- [2] C.M. Loughrey, M.A. Preece, A. Green, Sudden unexpected death in infancy (SUDI), *J. Clin. Pathol.* 58 (2005) 20–21.
- [3] M.J. Bennett, S. Powell, Metabolic disease and sudden, unexpected death in infancy, *Hum. Pathol.* 25 (1994) 742–746.
- [4] J.B. Lundemose, S. Kolvraa, N. Gregersen, E. Christensen, M. Gregersen, Fatty acid oxidation disorders as primary cause of sudden and unexpected death in infants and young children: an investigation performed on cultured fibroblasts from 79 children who died aged between 0–4 years, *Mol. Pathol.* 50 (1997) 212–217.
- [5] R.G. Boles, E.A. Buck, M.G. Blitzer, M.S. Platt, T.M. Cowan, S.K. Martin, H. Yoon, J.A. Madsen, M. Reyes-Mugica, P. Rinaldo, Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life, *J. Pediatr.* 132 (1998) 924–933.
- [6] D.H. Chace, J.C. DiPerna, B.L. Mitchell, B. Sgroi, L.F. Hofman, E.W. Naylor, Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1166–1182.
- [7] R.L. Wilcox, C.C. Nelson, P. Stenzel, R.D. Steiner, Postmortem screening for fatty acid oxidation disorders by analysis of Guthrie cards with tandem mass spectrometry in sudden unexpected death in infancy, *J. Pediatr.* 141 (2002) 833–836.
- [8] J.P. Bonnefont, F. Demaugre, C. Prip-Buus, J.M. Saudubray, M. Brivet, N. Abadi, L. Thuillier, Carnitine palmitoyltransferase deficiencies, *Mol. Genet. Metab.* 68 (1999) 424–440.
- [9] E. Sigauke, D. Rakheja, K. Kitson, M.J. Bennett, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review, *Lab. Invest.* 83 (2003) 1543–1554.
- [10] J.P. Bonnefont, F. Djouadi, C. Prip-Buus, S. Gobin, A. Munnich, J. Bastin, Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects, *Mol. Aspects Med.* 25 (2004) 495–520.
- [11] G. Hug, S. Soukup, H. Berry, K. Bove, Carnitine palmitoyl transferase (CPT): deficiency of CPT II but not of CPT I with reduced total and free carnitine but increased acylcarnitine, *Pediatr. Res.* 25 (1989) 115A.
- [12] G. Hug, K.E. Bove, S. Soukup, Lethal neonatal multiorgan deficiency of carnitine palmitoyltransferase II, *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1862–1864.
- [13] A.B. Zinn, V.L. Zurcher, F. Kraus, C. Strohl, M.C. Walsh-Sukys, C.L. Hoppel, Carnitine palmitoyltransferase B (CPT B) deficiency: a heritable cause of neonatal cardiomyopathy and dysgenesis of the kidney, *Pediatr. Res.* 29 (1991) 73A.
- [14] F. Demaugre, J.P. Bonnefont, M. Colonna, C. Cepanec, J.P. Leroux, J.M. Saudubray, Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatomuscular symptoms and sudden death. Physiopathological approach to carnitine palmitoyltransferase II deficiencies, *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 859–864.
- [15] S. DiMauro, P.M. DiMauro, Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria, *Science* 182 (1973) 929–931.
- [16] N. Longo, C. Amat di San Filippo, M. Pasquali, Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 142C (2006) 77–85.
- [17] M. Kompare, W.B. Rizzo, Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders, *Semin. Pediatr. Neurol.* 15 (2008) 140–149.
- [18] J.R. Thompson, L.A. Marcelino, M.F. Polz, Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by “reconditioning PCR”, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 2083–2088.
- [19] F. Taroni, E. Verderio, S. Fiorucci, P. Cavadini, G. Finocchiaro, G. Uziel, E. Lamantea, C. Gellera, S. DiDonato, Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 8429–8433.
- [20] S. Yamamoto, H. Abe, T. Kohgo, A. Ogawa, A. Ohtake, H. Hayashibe, H. Sakuraba, Y. Suzuki, S. Aramaki, M. Takayanagi, S. Hasegawa, H. Niimi, Two novel gene mutations (Glu174→Lys, Phe383→Tyr) causing the “hepatic” form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Hum. Genet.* 98 (1996) 116–118.
- [21] K. Wataya, J. Akanuma, P. Cavadini, Y. Aoki, S. Kure, F. Invernizzi, I. Yoshida, J. Kira, F. Taroni, Y. Matsubara, K. Narisawa, Two CPT2 mutations in three Japanese patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency: functional analysis and association with polymorphic haplotypes and two clinical phenotypes, *Hum. Mutat.* 11 (1998) 377–386.
- [22] T. Yasuno, H. Kaneoka, T. Tokuyasu, J. Aoki, S. Yoshida, M. Takayanagi, A. Ohtake, M. Kanazawa, A. Ogawa, K. Tojo, T. Saito, Mutations of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) in Japanese patients with CPT II deficiency, *Clin. Genet.* 73 (2008) 496–501.
- [23] J. Aoki, T. Yasuno, H. Sugie, H. Kido, I. Nishino, Y. Shigematsu, M. Kanazawa, M. Takayanagi, M. Kumami, K. Endo, H. Kaneoka, M. Yamaguchi, T. Fukuda, T. Yamamoto, A Japanese adult form of CPT II deficiency associated with a homozygous F383Y mutation, *Neurology* 69 (2007) 804–806.
- [24] L.M. Ernst, N. Sondheimer, M.A. Deardorff, M.J. Bennett, B.R. Pawel, The value of the metabolic autopsy in the pediatric hospital setting, *J. Pediatr.* 148 (2006) 779–783.
- [25] Z. Yang, P.E. Lantz, J.A. Ibdah, Post-mortem analysis for two prevalent beta-oxidation mutations in sudden infant death, *Pediatr. Int.* 49 (2007) 883–887.
- [26] T. Sawaguchi, H. Nishida, Fatty liver in sudden infant death autopsies, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 19 (1998) 294.
- [27] R. Pierre, Liver including tumors, gallbladder, and biliary tree, in: J. Optiz, E. Gilbert-Barnes, R. Kapur, L.L. Oligny, J. Siebert (Eds.), *Potter's Pathology of the fetus, Infant and Child*, Mosby, St. Louis, 2007, pp. 1251–1255.
- [28] C. Gellera, D.R. Witt, E. Verderio, P. Cavadini, S. DiDonato, F. Taroni, Molecular study of lethal neonatal carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) A168.
- [29] F. Taroni, E. Verderio, F. Dworzak, P.J. Willems, P. Cavadini, S. DiDonato, Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients, *Nat. Genet.* 4 (1993) 314–320.
- [30] F. Taroni, C. Gellera, P. Cavadini, Lethal carnitine palmitoyltransferase deficiency in new-borns: a molecular genetic study, *Am. J. Hum. Genet.* 55 (1994) A245.
- [31] E. Verderio, P. Cavadini, L. Montermini, H. Wang, E. Lamantea, G. Finocchiaro, S. DiDonato, C. Gellera, F. Taroni, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 19–29.
- [32] J.P. Bonnefont, F. Taroni, P. Cavadini, C. Cepanec, M. Brivet, J.M. Saudubray, J.P. Leroux, F. Demaugre, Molecular analysis of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatocardiomyopathy expression, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 971–978.
- [33] T. Wieser, M. Deschauer, S. Zierz, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: three novel mutations, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 414.
- [34] B.Z. Yang, J.H. Ding, D. Roe, F. Demaugre, M. Brivet, C.R. Roe, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical forms and mutations in: Proceedings, International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Vienna, Austria, May 21–25, 1997, p. 202.
- [35] B.Z. Yang, J.H. Ding, D. Roe, T. Dewese, D.W. Day, C.R. Roe, A novel mutation identified in carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 63 (1998) 110–115.
- [36] B.Z. Yang, J.H. Ding, T. Dewese, D. Roe, G. He, J. Wilkinson, D.W. Day, F. Demaugre, D. Rabier, M. Brivet, C. Roe, Identification of four novel mutations in patients with carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 64 (1998) 229–236.
- [37] L. Ijst, A.G. Hendriksen, J.P.N. Ruiten, R.J. Wanders, Molecular basis of CPT II deficiency: identification of 9 novel mutations, *J. Inher. Metab. Dis.* 22 (Suppl 1) (1999) A53.
- [38] R.T. Taggart, D. Smail, C. Apolito, G.D. Vladutiu, Novel mutations associated with carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Hum. Mutat.* 13 (1999) 210–220.
- [39] M.A. Martin, J.C. Rubio, P. del Hoyo, A. Garcia, F. Bustos, Y. Campos, A. Cabello, J.M. Culebras, J. Arenas, Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Hum. Mutat.* 15 (2000) 579–580.
- [40] C. Bruno, M. Bado, C. Minetti, G. Cordone, S. DiMauro, Novel mutation in the CPT II gene in a child with periodic febrile myalgia and myoglobinuria, *J. Child Neurol.* 15 (2000) 390–393.
- [41] M. Deschauer, T. Wieser, R. Schroder, S. Zierz, A novel nonsense mutation (515del4) in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 75 (2002) 181–185.
- [42] R.J. Smeets, J.A. Smeitink, B.A. Semmekrot, H.R. Scholte, R.J. Wanders, L.P. van den Heuvel, A novel splice site mutation in neonatal carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *J. Hum. Genet.* 48 (2003) 8–13.
- [43] M. Deschauer, Z.M. Chrzanosowska-Lightowlers, E. Biekmann, M. Pourfarzam, R.W. Taylor, D.M. Turnbull, S. Zierz, A splice junction mutation in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 79 (2003) 124–128.
- [44] T. Wieser, M. Deschauer, K. Olek, T. Hermann, S. Zierz, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: molecular and biochemical analysis of 32 patients, *Neurology* 60 (2003) 1351–1353.
- [45] L. Thuillier, H. Rostane, V. Droin, F. Demaugre, M. Brivet, N. Kadhom, C. Prip-Buus, S. Gobin, J.M. Saudubray, J.P. Bonnefont, Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency, *Hum. Mutat.* 21 (2003) 493–501.
- [46] M.C. Orngreen, M. Duno, R. Ejstrup, E. Christensen, M. Schwartz, M. Sacchetti, J. Vissing, Fuel utilization in subjects with carnitine palmitoyltransferase 2 gene mutations, *Ann. Neurol.* 57 (2005) 60–66.
- [47] H. Kaneoka, N. Uesugi, A. Moriguchi, S. Hirose, M. Takayanagi, S. Yamaguchi, Y. Shigematsu, T. Yasuno, Y. Sasatomi, T. Saito, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency due to a novel gene variant in a patient with rhabdomyolysis and ARF, *Am. J. Kidney Dis.* 45 (2005) 596–602.
- [48] P.J. Isackson, M.J. Bennett, G.D. Vladutiu, Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 89 (2006) 323–331.
- [49] P.J. Isackson, M.J. Bennett, U. Lichter-Konecki, M. Willis, W.L. Nyhan, V.R. Sutton, I. Tein, G.D. Vladutiu, CPT2 gene mutations resulting in lethal neonatal or severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 422–427.
- [50] S. Semba, H. Yasujima, T. Takano, H. Yokozaki, Autopsy case of the neonatal form of carnitine palmitoyltransferase-II deficiency triggered by a novel disease-causing mutation del1737C, *Pathol. Int.* 58 (2008) 436–441.

- [51] S. Corti, A. Bordoni, D. Ronchi, O. Musumeci, M. Aguenouz, A. Toscano, C. Lamperti, N. Bresolin, G.P. Comi, Clinical features and new molecular findings in Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency, *J. Neurol. Sci.* 266 (2008) 97–103.
- [52] S. Illsinger, T. Lucke, M. Peter, J.P. Ruiten, R.J. Wanders, M. Deschauer, I. Handig, W. Wuyts, A.M. Das, Carnitine-palmitoyltransferase 2 deficiency: novel mutations and relevance of newborn screening, *Am. J. Med. Genet. A* 146A (2008) 2925–2928.
- [53] D. Yao, H. Mizuguchi, M. Yamaguchi, H. Yamada, J. Chida, K. Shikata, H. Kido, Thermal instability of compound variants of carnitine palmitoyltransferase II and impaired mitochondrial fuel utilization in influenza-associated encephalopathy, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 718–727.
- [54] Y.S. Hsiao, G. Jogl, V. Esser, L. Tong, Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (2006) 974–980.
- [55] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, S. Fukuda, H. Kobayashi, S. Yamaguchi, Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 46–51.
- [56] M. Dott, D. Chace, M. Fierro, T.A. Kalas, W.H. Hannon, J. Williams, S.A. Rasmussen, Metabolic disorders detectable by tandem mass spectrometry and unexpected early childhood mortality: a population-based study, *Am. J. Med. Genet. A* 140 (2006) 837–842.
- [57] Y. Shigematsu, S. Hirano, I. Hata, Y. Tanaka, M. Sudo, N. Sakura, T. Tajima, S. Yamaguchi, Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 776 (2002) 39–48.



A patient with mitochondrial trifunctional protein deficiency due to the mutations in the *HADHB* gene showed recurrent myalgia since early childhood and was diagnosed in adolescence[☆]

Mariko Yagi^{a,*}, Tomoko Lee^a, Hiroyuki Awano^a, Masahiro Tsuji^b, Go Tajima^c, Hironori Kobayashi^d, Yuki Hasegawa^d, Seiji Yamaguchi^d, Yasuhiro Takeshima^a, Masafumi Matsuo^a

^a Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, Japan

^b Department of Pediatrics, Kobe City Medical Center General Hospital, Japan

^c Department of Pediatrics, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan

^d Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2011

Received in revised form 20 September 2011

Accepted 20 September 2011

Available online 28 September 2011

Keywords:

Rhabdomyolysis

Fatty acid oxidation

Mitochondrial trifunctional protein (MTP)

Long-chain 3-ketoacyl-CoA dehydrogenase (LKAT)

HADHB gene

ABSTRACT

Mitochondrial trifunctional protein (MTP) is a multienzyme complex involved in the metabolism of long-chain hydroxyacyl-CoA, a product of the fatty acid β -oxidation cycle. MTP is an $\alpha\beta\beta$ hetero-octomer encoded by two different genes: *HADHA* (OMIM 600890) and *HADHB* (OMIM 143450). MTP deficiency induces three different types of presentation: (1) a lethal phenotype with neonatal onset (severe); (2) a hepatic phenotype with infant onset (intermediate); and (3) a neuromyopathic phenotype with late-adolescent onset (mild). While acylcarnitine analysis has revealed increased levels of long-chain hydroxyacylcarnitine in blood when an MTP deficiency exists, the neuromyopathic type is usually asymptomatic and does not always result in an abnormality in acylcarnitine analysis results. We report here the case of a 13-year-old girl with recurrences of intermittent myalgia since her early childhood, for whom the disorder had not been definitely diagnosed. Since she was referred to our hospital because of rhabdomyolysis, we have repeatedly performed blood acylcarnitine analysis and found slight increases in long-chain 3-OH-acylcarnitine levels, on the basis of which we made a chemical diagnosis of MTP deficiency. Immunoblot analysis of skin fibroblasts revealed loss of α - and β -subunits of MTP. In addition, analysis of the *HADHB* gene, which encodes long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase, one of the enzymes constituting MTP, identified compound heterozygous mutations of c.520 C>T (p.R141C) and c.1331 G>A (p.R411K).

MTP deficiency is considered an extremely rare disorder, as only five cases (lethal phenotype, two patients; hepatic phenotype, two patients; and neuromyopathic phenotype, one patient) have thus far been reported in Japan. However, it is likely that the neuromyopathic phenotype of MTP deficiency has not yet been diagnosed among patients with recurrences of intermittent myalgia and rhabdomyolysis, as in our patient reported here.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondrial trifunctional protein (MTP) is a multienzyme complex involved in the metabolism of long-chain hydroxyacyl-CoA, a product of the fatty acid β -oxidation cycle [1]. When an abnormality exists in this complex, the fatty acid β -oxidation cycle fails to supply an adequate amount of energy, resulting in three different types of presentation: a lethal phenotype with neonatal onset, in which hepatic and/or cardiac muscular disturbance occurs early in infancy,

causing sudden death; a hepatic phenotype with infant onset, in which non- or low-ketotic hypoglycemia occurs; and a neuromyopathic phenotype with late-adolescent onset, in which muscular symptoms such as intermittent myalgia or rhabdomyolysis occur [2,3]. The diagnosis is based on increased levels of long-chain 3-OH-acylcarnitine, as demonstrated by blood acylcarnitine analysis using ESI-MS/MS. However, the neuromyopathic phenotype is usually asymptomatic and frequently shows no abnormal test results; therefore, its definite diagnosis may require an extended length of time.

A 13-year-old girl with repeated myalgia since early childhood, in whom MTP deficiency had not been diagnosed, was referred to our hospital because of rhabdomyolysis. We repeatedly performed blood acylcarnitine analysis, found slight increases in long-chain 3-OH-acylcarnitine levels, and finally diagnosed MTP deficiency by Western blot and genetic analysis.

[☆] Databases: *HADHA* OMIM:600890, GDB:434026, GenBank:NM_000182;*HADHB* OMIM:143450, GDB:344953, GenBank:NM_000183

* Corresponding author at: Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1, Kusunokicho, Chuo, Kobe, Hyogo 6500017, Japan. Fax: +81 78 382 6099.

E-mail address: myagi@med.kobe-u.ac.jp (M. Yagi).

2. Materials and methods

2.1. Case

The 13-year-old girl was the first child of non-consanguineous parents, and was born at 42 weeks of gestation after an uneventful pregnancy. Her birth weight was 3032 g. One month after birth, an apparent life-threatening event (ALTE) developed; however, she showed normal growth and development. From the age of 3 years, she complained of pain in her leg muscles after walking over a long distance. From the age of 9 years, the frequency of intermittent acute muscle pain increased and even mild exercise occasionally caused severe discomfort in her leg muscles. The symptom was often triggered by infection and menstruation. She experienced bouts of muscle pain after hard exercise such as running on a school field day or hiking on a school excursion. After hard exercise, she felt difficulty in moving because of unusual severe pain in her generalized muscles. Serum acylcarnitine analysis performed at 10 years of age revealed slightly increased levels of long-chain acylcarnitine, on the basis of which very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency was suspected. However, her VLCAD activity was normal and the disorder had not been definitely diagnosed.

At the age of 13 years, she was admitted to Kobe University Hospital with severe myalgia over the whole body. On admission, hematological and biochemical investigations revealed markedly elevated serum creatine kinase (22,885 IU/L), aldolase (62.6 IU/L), and myoglobin (2960 ng/mL). Plasma free and total carnitine and total ketone bodies concentration were normal (Table 1). Echocardiography and electrocardiography did not reveal any evidence of a cardiomyopathy.

Table 1
Laboratory findings upon hospitalization.

<Blood biochemistry>			Reference range
AST	529	IU/L	13–31
ALT	205	IU/L	8–34
LDH	909	IU/L	115–217
CK	22,885	IU/L	46–168
CK-MB	434	IU/L	0–25
Aldolase	62.6	IU/L	2.2–5.5
Myoglobin	2960	ng/mL	0–60
BUN	11	mg/dL	9–22
Cre	0.34	mg/dL	0.5–1.3
T.chol	167	mg/dL	146–219
TG	58	mg/dL	28–149
Glu	180	mg/dL	61–92
Lactic acid	19.1	mg/dL	3–17
Pyruvic acid	1.47	mg/dL	0.3–0.94
Total ketone bodies	39	μmol/L	26–122
Acetoacetate	24	μmol/L	13–69
β-hydroxy butyrate	15	μmol/L	0–76
Total carnitine	57	μmol/L	45–91
Free carnitine	45.7	μmol/L	36–74
Acylcarnitine	11.3	μmol/L	6–23
<Acylcarnitine analysis>			Reference range
<i>(Blood spot)</i>			
C14:1	0.21	μM	<0.4
C14:OH	0.12	μM	<0.12
C16:1	0.15	μM	<0.785
C16:0-OH	0.18	μM	<0.12
C18-OH	0.066	μM	<0.1
C18:1-OH	0.15	μM	<0.07
<i>(Serum)</i>			
C14:1	0.4	μM	<0.1
C14:OH	0.2	μM	<0.1
C16:1	0.2	μM	<0.1
C16:0-OH	0.16	μM	<0.8
C18-OH	0.077	μM	<0.05
C18:1-OH	0.13	μM	<0.7

2.2. Methods

2.2.1. Urine organic acid and acylcarnitine analysis

Urine organic acid and blood acylcarnitine analysis from dried blood spots and serum were performed by GC/MS and ESI-MS/MS, respectively, as described in detail previously [4].

2.2.2. Cell culture

Fibroblasts from the patient were cultured in Eagle's minimum essential medium containing 10% fetal calf serum and antibiotics (100 μg/mL each of penicillin and streptomycin; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

2.2.3. Western blot analysis

Western blot analysis was performed following 12.5% SDS/PAGE [5] using rabbit polyclonal antibodies raised against purified MTP protein as the primary antibody. Bound antibodies were visualized using the ImmunoPure NBT/BCIP Substrate Kit (Promega, Madison WI, USA). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay protocol (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.2.4. Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from the patient's fibroblasts using a QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen GmbH Hilden, Germany). We designed 20 sets of primers for amplification of *HADHA* (one for each exon, including 5' and 3' splice sites), and 16 sets for amplification of *HADHB*. Each exon was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and directly sequenced as described previously [6].

3. Results

3.1. Urine organic acid and acylcarnitine analysis

Urine organic acid analysis performed at the same time revealed slight ketosis (as indicated by slightly increased excretion of 3-OH-butyrate), low-ketotic dicarboxylic aciduria (as indicated by increased excretion of adipate and suberate), and 3-OH dicarboxylic aciduria (as indicated by increased excretion of 3-OH-sebacate and 3-OH-dodecanedioate).

Acylcarnitine analysis of blood spots at the time of hospitalization revealed increases in the levels of long-chain 3-OH-acylcarnitines (C14-OH, C16-OH, C18-1-OH). The changes indicated an MTP deficiency. On the other hand, elevation of both long-chain acylcarnitines (C14-1, C16-1) and long-chain 3-OH-acylcarnitines (C14-OH, C18-OH) in serum suggested a VLCAD deficiency (Table 1). These findings strongly suggested long-chain fatty acid metabolism disorder, VLCAD or MTP deficiency, however, it was difficult to distinguish between the two. So acylcarnitine analysis was performed another four times, with inconsistent results: slightly increased levels of long-chain 3-OH-acylcarnitine (C16-OH, C18-1-OH), a feature of MTP deficiency, were noted on two occasions, while no abnormality was noted on the other two occasions. On the basis of these results and her clinical manifestations, we made a chemical diagnosis of a mild form of MTP deficiency, in which neither symptoms nor abnormal laboratory findings are noted during attack-free intervals.

3.2. Western blot analysis

Western blot analysis using samples extracted from the patient's skin fibroblasts detected neither α- nor β-subunits of MTP (Fig. 1), whereas both subunits were detected in control fibroblasts. These findings showed that the patient had an MTP deficiency.

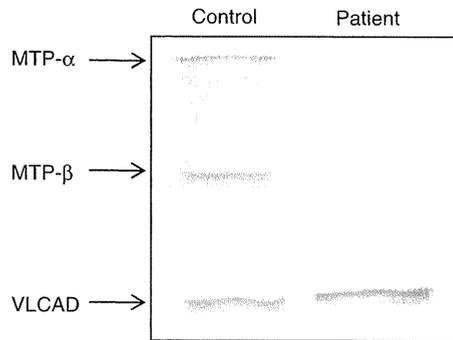


Fig. 1. Western blot analysis of cultured skin fibroblasts of mitochondrial trifunctional protein. MTP α - and MTP β - were not detectable in the patient's fibroblasts. MTP α - and MTP β -, α - and β -subunits of MTP, respectively; VLCAD, very long-chain acyl-CoA dehydrogenase.

3.3. Mutation analysis

Analysis of the genes encoding MTP component enzymes identified compound heterozygous mutations of c.520 C>T/c.1331 G>A (p.R141C/p.R411K) in the *HADHB* gene encoding long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase (LCT), one of the enzymes constituting MTP. No mutation was found in the *HADHA* gene.

4. Discussion

Fatty acid metabolism plays an important role in energy supply in the body. Its pathways comprise intake of fatty acids from cell membranes, the fatty acid β -oxidation cycle, an electron transport chain, and production of ketone bodies. More than 20 enzymes and transporters are known to be involved in the metabolism.

MTP resides in the mitochondrial inner membrane, and is a multi-enzyme complex involved in the metabolism of long-chain hydroxyacyl-CoA. In MTP deficiency, β -oxidation of long-chain fatty acids is impaired; the deficiency is asymptomatic when the supply and demand of energy is in balance; however, if the energy supply is inadequate when the demand for energy is increased by infection, disease, exercise, or elongated intervals between meals, the body cannot handle the energy shortage. Symptoms occur in organs requiring large amounts of energy produced by the metabolism of fatty acids, such as the brain, cardiac muscle, liver, and skeletal muscle. The patient reported here began to repeatedly complain of leg pain after exercise at around the age of 3 years, and as she grew up, her muscle symptoms became more prominent. These findings led us to conclude that her clinical manifestations were of the muscular type of MTP deficiency. In addition, an ALTE occurred at the age of one month. It was assumed that this episode might also have been related to MTP deficiency.

MTP deficiency is a very rare disorder, and has thus far been reported in only about 50 patients (of whom 20 were classified as having the neuromyopathic phenotype) in Europe and North America, and in five patients (of whom only one had the neuromyopathic phenotype) in Japan. In many patients with the muscular type, the time from onset to definite diagnosis was long. Spiekerkoetter et al. investigated the clinical manifestations of 11 patients with muscular-type MTP deficiency and reported an average period from initial onset of the disorder to diagnosis of 5 years and 10 months [7]. In the one patient with muscular-type MTP deficiency reported in Japan, rhabdomyolysis began to repeatedly occur at the age of 15 years, and a definite diagnosis was made at the age of 23 years [8]. More recently, it has become possible to perform less expensive, more convenient, and highly accurate blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry, which has resulted in diagnosis of a fatty acid metabolism disorder in an increasing number of

patients. MTP deficiency is characterized by increased 3-OH-acylcarnitine (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1) in serum (or plasma) or blood spots, demonstrated by acylcarnitine analysis, whereas the analysis does not detect any abnormality when no episodic symptoms occur [9]. In our patient, we repeatedly performed blood acylcarnitine analysis and found no consistent results. In the first analysis, the profile from the blood spots indicated an MTP deficiency, while that from the serum indicated a VLCAD deficiency. It was difficult to distinguish between VLCAD and MTP deficiency on the basis of results from the first analysis. In the following analysis, a slight increase in the levels of long-chain 3-OH-acylcarnitines, a feature of MTP deficiency, was noted on some occasions, but no abnormality was detected on other occasions. Comprehensive evaluation of these acylcarnitine analysis results and her clinical manifestations were highly suggestive of MTP deficiency. Furthermore, diagnosis was confirmed by Western blot analysis and genetic analysis. When patients with recurrent myalgia and rhabdomyolysis are examined on the assumption that fatty acid disorder including MTP deficiency may be diagnosed, it is important to repeatedly perform acylcarnitine analysis using samples obtained while symptoms occur.

MTP is an octamer composed of four α -subunits that function as long-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenases (LCHADs) and long-chain enoyl-CoA hydratases (LCEHs), and four β -subunits that function as LCTs [10]. LCHAD and LCEH subunits are encoded by the *HADHA* gene, and LCT subunits are encoded by the *HADHB* gene. These two genes are adjacently located in the human chromosome region 2q23 [11], and consist of 20 and 16 exons, respectively [12,13]. The c.1331 G>A (p.R411K) mutation detected by the *HADHB* gene analysis in our patient is the same as that found by Orii et al. in two Japanese family lines with MTP deficiency, which they reported was mild in both patients [14]. On the other hand, the c.520 C>T (p.R141C) mutation has never been reported, and is therefore novel. Because the latter mutation was not detected in 50 normal controls and Arg141 is conserved in different species, we concluded that the c.520 C>T (p.R141C) mutation was a causative mutation.

Some investigators have compared the neuromyopathic phenotype of MTP deficiency with the lethal phenotype and found that the neuromyopathic phenotype is associated with better preserved enzyme activities and is more closely related to protein expression and clinical manifestations [15,16]. In our patient, the clinical manifestations fell into the category of the neuromyopathic phenotype, but Western blot analysis detected neither α - nor β -subunits of MTP. It has been reported that MTP exerts enzymatic activities in a stable manner only when the α - and β -subunits making up the octameric MTP are all normal, and that mutant proteins yield dominant negative effects to inhibit the activities of normal proteins [17]. However, the reason for this apparent discrepancy between the phenotype and the enzyme activities remains unclear.

5. Conclusion

In patients with recurrent muscular symptoms such as myalgia and rhabdomyolysis, a fatty acid metabolism disorder such as MTP deficiency should be a suspected etiology, even when tests performed during attack-free intervals frequently detect no abnormalities. For the purpose of diagnosing MTP deficiency in these patients, it is important to suspect the disorder on the basis of their past histories and to repeatedly perform acylcarnitine analysis when attacks occur. The biochemical findings in VLCAD and MTP deficiency can overlap, which occurred in our patient and suggest that suspected deficiency of either should lead to Western blot and genetic analysis to rule out both when appropriate. MTP deficiency is a rare disorder, and its rareness may be explained by the presence of patients with recurrent muscular symptoms in whom the disorder has not yet been diagnosed.

References

- [1] Y. Uchida, K. Izai, T. Orii, T. Hashimoto, Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/ 3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1034–1041.
- [2] R.J. Wanders, L. Ijlst, F. Poggi, J.P. Bonnefont, A. Munnich, M. Brivet, D. Rabier, J.M. Saudubray, Human trifunctional protein deficiency: a new disorder of mitochondrial fatty acid beta-oxidation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (1992) 1139–1145.
- [3] L. Ijlst, R.J. Wanders, S. Ushikubo, T. Kamijo, T. Hashimoto, Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, *Biochem. Biophys. Acta* 1215 (1994) 347–350.
- [4] Y. Hasegawa, M. Iga, M. Kimura, Y. Shigematsu, S. Yamaguchi, Prenatal diagnosis for organic acid disorders using two mass spectrometric methods, gas chromatography mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 823 (2005) 13–17.
- [5] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76 (1979) 4350–4354.
- [6] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, S. Fukuda, H. Kobayashi, S. Yamaguchi, Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency, *J. Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 46–51.
- [7] U. Spiekerkoetter, M.J. Bennett, B. Ben-Zeev, A.W. Strauss, I. Tein, Peripheral neuropathy, episodic myoglobinuria, and respiratory failure in deficiency of the mitochondrial trifunctional protein, *Muscle Nerve* 29 (2004) 66–72.
- [8] H. Miyajima, K.E. Orii, Y. Shindo, T. Hashimoto, T. Shinka, T. Kuhara, I. Maetsumoto, H. Shimizu, E. Kaneko, Mitochondrial trifunctional protein deficiency associated with recurrent myoglobinuria in adolescence, *Neurology* 49 (1997) 833–837.
- [9] M. Kompore, B.R. William, Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders, *Semin. Pediatr. Neurol.* 15 (2008) 140–149.
- [10] T. Kamijo, T. Aoyama, A. Komiyama, T. Hashimoto, Structural analysis of cDNAs for subunits of human mitochondrial fatty acid beta-oxidation trifunctional protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 818–825.
- [11] B.Z. Yang, H.H.Q. Heng, J.H. Ding, C.R. Roe, The genes for alpha and beta subunits of the mitochondrial trifunctional protein are both located in the same region of human chromosome 2q23, *Genomics* 37 (1996) 141–143.
- [12] U. Spiekerkoetter, B. Sun, Z. Khuchua, M.J. Bennett, A.W. Strauss, Molecular and phenotypic heterogeneity in mitochondrial trifunctional protein deficiency due to beta-subunit mutations, *Hum. Mut.* 21 (2003) 598–607.
- [13] K.E. Orii, K.O. Orii, M. Souri, T. Orii, N. Kondo, T. Hashimoto, T. Aoyama, Genes for human mitochondrial trifunctional protein alpha- and beta-subunits are divergently transcribed from a common promoter region, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8077–8084.
- [14] K.E. Orii, T. Aoyama, K. Wakui, Y. Fukushima, H. Miyajima, S. Yamaguchi, T. Orii, N. Kondo, T. Hashimoto, Genomic and mutational analysis of the mitochondrial trifunctional protein beta-subunit (HADHB) gene in patients with trifunctional protein deficiency, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1215–1224.
- [15] U. Spiekerkoetter, Z. Khuchua, Z. Yue, M.J. Bennett, A.W. Strauss, General mitochondrial trifunctional protein (TFP) deficiency as a result of either alpha- or beta-subunit mutations exhibits similar phenotypes because mutations in either subunit alter TFP complex expression and subunit turnover, *Ped. Res.* 55 (2004) 190–196.
- [16] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, H. Kobayashi, H. Li, Y. Mushimoto, S. Fukuda, S. Yamaguchi, Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 372–377.
- [17] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, S. Fukuda, H. Kobayashi, S. Yamaguchi, Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 46–51.

特 集

新生児医療の最前線—産婦人科医が知っておきたい新生児の新知識

新生児突然死とその予防

The prevention of sudden neonatal death

虫本 雄一
MUSHIMOTO Yuichi

山口 清次*
YAMAGUCHI Seiji

島根大学医学部小児科学教室 *教授

先天代謝異常症の一部に、乳幼児突然死症候群に類似した発症形態をとる疾患がある。アミノ酸・有機酸代謝異常症では哺乳後の蛋白負荷時に、脂肪酸代謝異常症では哺乳が確立する前や感染罹患に伴う経口摂取不良時に発症しやすい。近年、ガスリー法にかわるタンデムマスによる新しい新生児マススクリーニングが拡大しつつある。新生児突然死の病態解明、また先天代謝異常症による新生児突然死の予防が期待されている。

Key Words

乳幼児突然死症候群, SIDS, 新生児マススクリーニング, タンデムマス, 新生児

はじめに

新生児期は、子宮内環境から子宮外環境への適応の時期である。胎内で保たれていた均衡が崩れると、もともと存在していた疾患が突然に顕在化し、呼吸障害、哺乳低下、痙攣、意識障害、そして突然死をきたすこともある。

早期新生児期に突然死を起こしうる病態を表1に示す¹⁾。B群溶連菌の早発型は急激に発症する。

また、重篤な心奇形であっても出産後早期には必ずしも明らかな症状がない場合があり、動脈管が閉鎖した途端に状態が悪化し死亡することはよく知られている。一方、乳幼児突然死症候群(SIDS; sudden infant death syndrome)は、「それまでの健康状態および既往歴からその死亡が予測できず、しかも死亡状況調査および解剖検査においもその原因が同定されない、原則として、1歳未満の児に突然の死をもたらした症候群²⁾」であるが、SIDSの原因はいまだに解明されていない。

表1 早期新生児期に突然死を起こしうる疾患

- 1) 感染: B群溶連菌(GBS), 単純ヘルペスなど
- 2) 先天性心疾患: 動脈管(PDA)依存型の心奇形, 不整脈(QT延長症候群など)
- 3) 先天代謝異常症(とくに有機酸, 脂肪酸代謝異常症)
- 4) 母体薬物使用の禁断症状
- 5) 窒息その他の事故
- 6) 無呼吸を起こしうる奇形, 腫瘍, 上気道・中枢神経系の異常
- 7) 犯罪

(仁志田博司, 1999¹⁾より一部改変)

近年、乳幼児突然死の原因として一部の先天代謝異常症、とくに有機酸・脂肪酸代謝異常症などが注目されている³⁾。これらは発症前に診断すれば、突然死を予防することが可能となる。そこで、SIDS 様症状で発症する先天代謝異常症とその発症機序、診断、また新生児スクリーニングの重要性について述べたい。

新生児突然死の予防のための タンデムマス・スクリーニング

近年、タンデムマスによる新しい新生児マススクリーニングが拡大しつつある⁴⁾。タンデムマス

法では、血液ろ紙を利用した一回の検査で表2に示すような疾患をスクリーニングできる⁵⁾。現行の新生児マススクリーニング(ガスリー法)対象疾患であるアミノ酸代謝異常症3疾患に加えて、約20疾患以上が検出可能である。わが国でのこれまでのパイロット研究によると、個々の疾患頻度は少ないが、全体の発生頻度は約9,000人に1人である⁴⁾⁶⁾。

タンデムマスによる新生児マススクリーニングは、1997年からパイロット研究が開始された。2003年からは厚生労働省科学研究費補助をうけ、現在は約20%の新生児が検査をうけており、今

表2 タンデムマス・スクリーニングで見つかる主な疾患

	タンデムマスの対象疾患	発症時期	主な臨床症状	発見頻度 ⁺	感度
アミノ酸代謝異常	1) フェニルケトン尿症*	新～乳	けいれん, 発達遅滞	1:6万	○
	2) メーブルシロップ尿症*	新～乳	多呼吸, アシドーシス	—	○
	3) ホモシスチン尿症*	新～乳	遅れ, 発育異常	—	○
	4) 高チロシン血症1型	新～乳	肝・腎不全	—	▲
	5) シトルリン血症(1型)	新～乳	興奮, 多呼吸, 昏睡	1:40万	○
	6) アルギニノコハク酸血症	新～乳	興奮, 多呼吸, 昏睡	1:80万	○
	7) アルギニン血症	新～乳	興奮, 多呼吸, 昏睡	—	▲
	8) シトリン欠損症	新～乳	一過性乳児肝炎類似症状	1:9万	▲
有機酸代謝異常	9) メチルマロン酸血症	新～乳	アシドーシス, 遅れ	1:11万	○
	10) プロピオン酸血症	新～乳	アシドーシス, 遅れ	1:4万	○
	11) 3-ケトチオラーゼ欠損症	新～乳	ケトアシドーシス発作	—	▲
	12) イソ吉草酸血症	新～乳	アシドーシス, 体臭	1:40万	○
	13) メチルクリトニグリシン尿症	新～乳	筋緊張低下, ライ症候群	1:13万	○
	14) HMG 血症	新～乳	ライ症候群, 低血糖	—	○
	15) 複合カルボキシラーゼ欠損症	新～乳	湿疹, 乳酸アシドーシス	1:40万	○
	16) グルタル酸血症1型	新～幼	アテトーゼ, 遅れ	1:20万	○
脂肪酸代謝異常	17) MCAD 欠損症	乳～幼	ライ症候群, SIDS	1:13万	○
	18) VLCAD 欠損症	乳～成	低血糖, 筋肉, 心障害	1:20万	○
	19) TFP(LCHAD) 欠損症	新～成	ライ症候群, SIDS	—	○
	20) CPT1 欠損症	新～乳	ライ症候群, 肝障害	1:27万	○
	21) CPT2 欠損症	新～成	ライ症候群, 筋肉症状	1:30万	▲
	22) TRANS 欠損症	新～乳	ライ症候群, SIDS	—	▲
	23) 全身性カルニチン欠乏症	乳～幼	ライ症候群, SIDS	1:20万	▲
	24) グルタル酸血症2型	新～乳	ライ症候群, 低血糖	1:16万	▲
	25) SCHAD 欠損症	新～乳	低血糖発作	1:80万	▲

略字(疾患名): HMG=3-OH-3-メチルグルタル酸; VLCAD=極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素; MCAD=中鎖アシル-CoA 脱水素酵素; LCHAD=長鎖3-OH-アシル-CoA 脱水素酵素; CPT=カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ, TRANS=トランスロカーゼ; SCHAD=短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素。

発症時期: 新=新生児; 乳=乳児期; 成=成人期。

*現行マススクリーニングの対象疾患。+ 発見頻度は、2008年時点でのパイロット研究の結果。

○: 一次対象疾患(おおむね発見できる。治療効果も期待できると判断される疾患)

▲: 二次対象疾患(現時点では、見落とし例や治療効果が不確実な可能性のある病気)

(山口清次, 2009⁵⁾による)

後も拡大すると考えられる⁷⁾。

■ ■ ■ 新生児突然死を起こす代表的な先天代謝異常症

新生児突然死、またはSIDS様症状で発症する代表的な先天代謝異常症を表3に示す⁸⁾。

タンデムマス・スクリーニングでは、有機酸代謝異常症と脂肪酸代謝異常症、および一部の尿素サイクル異常症(アルギニン血症、シトルリン血症、シトルリン欠損症、アルギニノコハク酸尿症)を含むアミノ酸代謝異常症が対象となる。

■ ■ ■ 先天代謝異常症における突然死の発症機序

アミノ酸・有機酸・脂肪酸代謝異常症の原因は、先天的な酵素障害による有毒物質の蓄積あるいはエネルギー不足による臓器障害である。胎児期には母体の代償機構が働いているため、出生後に新生児の体内で急速に代謝不全が起こると推定される。

新生児期の突然死の起こる機序として、1)低血糖発作、2)アシドーシス、高アンモニア血症などによる代謝不全による組織毒性がある。

1. 低血糖発作

体内でのエネルギー供給源の変化を図1に示す⁸⁾。生体はエネルギー源として食事からのグルコースを利用しているが、炭水化物からのエネルギー供給が不足したときは、①グリコーゲンやアラニンなどからの糖新生、②脂肪酸代謝からのケトン体産生を順番に使用する。

低血糖は、糖新生系異常症や脂肪酸代謝異常症でみられる症状である。通常、新生児期は3~4時間ごとに授乳を行うため低血糖は起こりにくい。しかし、重度の酵素活性障害がある場合には、授乳開始前の早期、または出生直後から経口哺乳が確立するまでの間に発症することもある。

2. 代謝不全による組織毒性

血中アンモニアや乳酸などの急激な上昇による

表3 新生児突然死を起こす可能性がある先天代謝異常症

1. 脂肪酸代謝異常症
a) 中鎖アシル CoA 脱水素酵素(MCAD)欠損症
b) 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症
c) カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1 (CPT 1)欠損症
d) カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2 (CPT 2)欠損症
e) アシルカルニチントランスロカーゼ(TRANS)欠損症
f) 全身性カルニチン欠乏症
g) グルタル酸血症2型
2. 有機酸代謝異常症
a) 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル酸(HMG)血症
b) プロピオン酸血症
c) メチルマロン酸血症
3. アミノ酸代謝異常症
a) メーブルンロップ尿症
b) 尿素サイクル異常症
4. 糖新生系異常症
a) 糖原病I型
b) フルクトース-1,6-ジフォスファターゼ(FDPase)欠損症
5. その他
a) グリセロールキナーゼ欠損症
b) 副腎過形成

(山口清次, 2009⁸⁾ より一部改変)

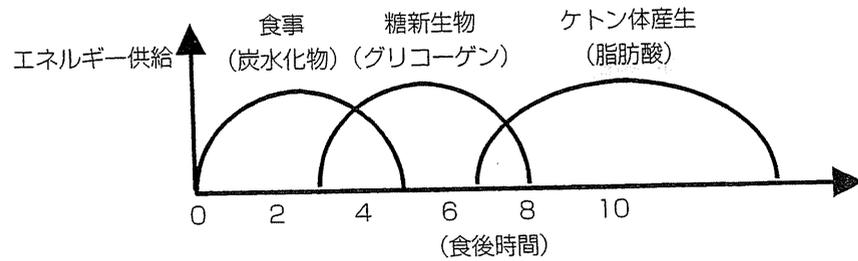


図1 体内のエネルギー供給源の変化

食事からの糖分摂取に引き続き、グリコーゲンからの糖新生が生じる。これらのエネルギー供給が減ると、脂肪酸酸化によるケトン体産生が始まる。脂肪酸代謝異常症は脂肪酸酸化の障害である。とくに長期間の飢餓や感染時など、エネルギー需要の亢進を契機に代謝不全を発症する。
(山口清次：母子保健情報, 2006⁹⁾による)

表4 先天代謝異常症の診断のために必要な検査と検体

検体	検体量	保存方法	測定
尿	最低2ml	冷凍	尿中有機酸分析 アミノ酸分析
血液ろ紙(ガスリー)	最低1スポット	冷凍	アシルカルニチン分析*
血清	最低0.5ml	冷凍	アシルカルニチン分析* アミノ酸分析
ヘパリン末梢血	5~10ml	冷蔵	酵素活性、遺伝子解析
皮膚生検	米粒大	常温 ホルマリンにつけない	酵素活性、遺伝子解析
胆汁	1ml	冷凍	アシルカルニチン分析*
臓器(肝, 脳, 腎)	約1g	冷凍 ホルマリンにつけない	酵素活性、遺伝子解析

(山口清次, 2009¹⁾より一部改変)

代謝不全が考えられる。蛋白負荷が発症の契機となるアミノ酸・有機酸代謝異常症では、出生直後よりも哺乳後から急激に症状が悪化することが多い。

活性測定や異常代謝産物の同定による生化学的診断を組み合わせることが多い⁹⁾。出生前診断の前提として、母親(発端者)の遺伝子診断を行っておく必要がある。

■ ■ ■ 出生前診断について

出生前診断の適応にはより慎重な対応が必要となる。タンデムマス・スクリーニングの対象疾患(表2)においては、出生後の診断により多くのケースが発症前から治療を開始することができる。グルタル酸血症2型の新生児型のような出生後早期に発症し重篤になる疾患では、出生前診断の適応となる場合もある。

出生前診断の際には、遺伝子検査のほか、酵素

■ ■ ■ 突然死に遭遇したときの対応

新生児突然死に遭遇した際、先天代謝異常症診断するために保存すべき検体を表4に示す³⁾。皮膚線維芽細胞があることで確定診断がつく症は多く、可能な限り採取したい。また、線維芽細胞や臓器が得られた場合には、ホルマリン固定を行わないことが重要である。正確な診断は次子についての遺伝相談や予防にも役立つ。

■ ■ ■ 先天代謝異常症を見逃さないために

先天代謝異常症の新生児期発症では、呼吸障害や哺乳力低下、嘔吐、けいれん、意識障害など、非特異的な症状を示すことが多い。Sepsis work up で感染徴候がなく、画像検査で特異的所見がみられない場合には、背景疾患として先天代謝異常症を念頭におく必要がある。代謝異常症を見逃さないために最初に行うべき検査は、血液ガス、血糖、アンモニア、乳酸、肝機能などである¹⁰⁾。最近の血液ガス分析では乳酸の測定ができるものが多いが、アンモニアの検査も忘れてはならない。最初の検査で異常を認めた場合には表4に示した検査を行い、鑑別を進めていく。

■ ■ ■ 早期診断、発症前診断の重要性

有機酸・脂肪酸代謝異常症について、タンデムマス・スクリーニングで発症前に診断された症例と、発症後に診断された症例の転帰を表5に示す。新生児スクリーニングで診断された患者では、有機酸代謝異常症の89%、脂肪酸代謝異常症の88%が正常な発育をしていた。一方、発症後に診断

表5 発症前診断例と発症後診断例の予後比較 (2001年～2008年の発見例)

疾 患	新生児スクリーニング で発症前に診断*	発症後に 診断**
患者数	66	152
有機酸代謝異常症	40	108
正常発達	35(89%)	20(18%)
後遺症	3(7%)	56(52%)
死亡	2(4%)	32(30%)
脂肪酸代謝異常症	26	44
正常発達	24(88%)	23(52%)
後遺症	1(4%)	9(20%)
死亡	1(4%)	12(28%)

*福井大学と厚生省研究班のパイロットスタディ。
**島根大学で診断した症例。
(山口清次, 2001⁷⁾による)

された症例での正常発達は、有機酸代謝異常症の18%、脂肪酸代謝異常症の52%であった⁷⁾。これらの結果からは、発症後に診断、治療するよりも、発症前に発見する重要性を示している。

SIDSの剖検例についてタンデムマスを行った結果、313症例中14例(4.4%)に脂肪酸代謝異常症が発見された報告もある¹¹⁾。新生児突然死の病態解明、撲滅のためにも新しいタンデムマスによる新生児マススクリーニングの普及が求められる。

文 献

- 仁志田博司：新生児の突然死。日本未熟児新生児学会雑誌 11：21-25, 1999.
- 中山雅弘, 中川 聡, 青木康博ほか：乳幼児突然死症候群(SIDS)診断の手引き 改訂第2版。J Jap SIDS Res Soc 6：73-97, 2006.
- 山口清次：新生児突然死の予防：タンデムマスによる早期発見。日本周産期・新生児医学会雑誌 45：973-976, 2009.
- 重松陽介, 畑 郁江：タンデムマスによる新生児マススクリーニング。小児内科 42：1200-1204, 2010.
- 山口清次：新しい新生児マススクリーニング タンデムマス Q & A 2009。厚生労働省科学研究(子ども家庭総合研究事業)研究班, p19-22, 2009.
- Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, et al：Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. Journal of chromatography B 776：39-48,

- 2002.
- 山口清次：タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究。厚生労働省科学研究(子ども家庭総合研究事業)研究班, 平成21年度総括・分担研究報告書(研究代表者 山口清次), p5-15, 2010.
- 山口清次：乳幼児突然死症候群(SIDS)と先天代謝異常症。母子保健情報 53：39-45, 2006.
- 長谷川有紀, 山口清次：先天代謝異常症の出生前診断。周産期医学 38(増刊)：161-164, 2008.
- 藤浪綾子, 高柳正樹：救急外来で見逃してはならない先天代謝異常症。小児科診療 69：1574-1578, 2006.
- Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, et al：Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. J Pediatr 132：924-933, 1998.

シンポジウム：先天代謝異常症マス・スクリーニングのこれから

タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題

山口清次

島根大学小児科

はじめに

わが国の新生児マススクリーニングは1977年より全国実施が始まり、これまでに約4,200万人の新生児が検査を受け、約1万6千人に異常が発見され、少なくとも1万人以上の小児が障害から免れたと考えられている。現在6種類の疾患が対象となっているが、タンデムマスを導入して対象疾患を拡大し、より多くの小児を障害発生から守ろうという動きがある。これを拡大スクリーニング (expanded newborn screening) といい、欧米先進国を中心に世界的に普及しつつある。わが国でも近い将来全国実施される可能性が高い。

わが国では2004年より厚生労働省研究班で、タンデムマスによる疾患発見頻度、導入の効果、診療支援体制の整備、費用対効果、精度管理等について検討されてきた。この研究成果をもとに拡大スクリーニングの諸問題について述べたい。

I. タンデムマスの対象疾患の設定

新生児マススクリーニングでは、できるだけ多くの疾患を発見すればよいものではない。対象疾患には満たすべき一定の要件がある。すなわち、見逃しが無いこと、治療法があること、早期発見によって障害予防ないし軽減できること、身近にアクセスできる診療体制が整っていること、費用対効果のすぐれていることなどである。

現在の対象疾患は、アミノ酸代謝異常3疾患、およびガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症 (CH)、先天性副腎過形成症 (CAH) であるが、拡大スクリーニングでは図1に示すように、アミノ酸代謝異常3疾患の部分、1回のタンデムマ

ス検査によって16疾患に拡大される。この16疾患を「1次対象疾患」としている。内訳は、アミノ酸代謝異常5疾患、有機酸代謝異常7疾患、および脂肪酸代謝異常4疾患である。

この他にも約10疾患が発見できるが、「現時点では見逃しがありうる」、「治療効果が明確にされていない」、あるいは「費用対効果が明らかでない」などの理由で、引き続き検討すべき「2次対象疾患」としている。2次対象疾患に関しては、研究班では発見されたら原則として伝える方針としているが、患者家族の「知りたくない権利」があるので検査する前に同意を取る必要がある。すでに全国実施されている欧米諸国では、「2次対象疾患」は検査しないように計器を設定し、万一発見されても無視する方針をとっている。

II. 採血時期の問題

タンデムマス検査による疾患の発見頻度は、表1に示すように、1次、2次対象疾患を合わせると約9千人に1人である。現時点で設定している1次対象疾患に限ると約1万1千人に1人である。欧米での発見頻度は4千～5千人に1人なので、わが国での頻度は半分以下である。このちがいの要因として、民族差、測定方法の違い、あるいは採血時期の違いについて検討を要する。欧米では採血時期が生後2～3日であるのに対し、わが国では生後5～6日である。

アミノ酸代謝異常、有機酸代謝異常は哺乳によるタンパク負荷によって患者を検出しやすくなるが、脂肪酸代謝異常では逆である。すなわち生後日数が経つほど測定値が低くなる可能性がある。従って脂肪酸代謝異常を見逃さないためには、現

表1. タンデムマスによる新生児マススクリーニングの結果 (パイロットスタディ)

	発見数 (カッコ内は2010年)	頻度	一次対象疾患 (16疾患)
アミノ酸代謝異常	42 (4)	1:3.0万	28
1) フェニルケトン尿症*	21 (2)	1:6万	21
2) メーブルシロップ尿症*	1 (1)	1:127万	1
3) ホモシスチン尿症*	0	0	0
4) シトルリン血症(1型)	5 (-)	1:25万	5
5) アルギニノコハク酸血症	1 (-)	1:127万	1
※ 高チロシン血症1型	0	0	-
※ アルギニン血症	0	0	-
※ シトルリン欠損症	14 (1)	1:9万	-
有機酸代謝異常	56 (9)	1:2.3万	56
6) メチルマロン酸血症	11 (-)	1:12万	11
7) プロピオン酸血症	28 (5)	1:5万	28
8) イソ吉草酸血症	3 (-)	1:42万	3
9) メチルクロトグリシン尿症	8 (2)	1:16万	8
10) HMG血症	0	0	0
11) MCD	2 (1)	1:63万	2
12) グルタル酸血症1型	6 (1)	1:21万	6
※ β ケトチオラーゼ欠損症	0	0	-
脂肪酸代謝異常	39 (7)	1:3.2万	25
13) MCAD欠損症	13 (5)	1:10万	13
14) VLCAD欠損症	8 (-)	1:16万	8
15) TFP(LCHAD)欠損症	0	0	0
16) CPT1欠損症	4 (-)	1:32万	4
※ 全身性カルニチン欠乏症	5 (-)	1:25万	-
※ CPT2欠損症	4 (1)	1:32万	-
※ CACT欠損症	0	0	-
※ グルタル酸血症2型	4 (1)	0	-
※ SCHAD欠損症	1 (-)	1:127万	-
計	141 (20)		109
発見頻度		1:9千	1:1.16万
スクリーニング新生児数 1997~ (2010年のみ)	1,266,824 (236,115)		

太字の疾患名は、対象疾患としている16疾患。*印は、現在対象となっているアミノ酸代謝異常症3疾患。
HMG = 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸、MCD = マルチプルカルボキシルーゼ欠損症、
MCAD, VLCAD = それぞれ中鎖、極長鎖アシル-CoA脱水素酵素、TFP = 三頭酵素、
LCHAD = 長鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素、SCHAD = 短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素。

は不可欠である。これまでのマススクリーニングでは、個人情報保護などを理由に協力が不十分な場合も多く、全国横断的に患者の臨床経過が把握されているとはいえない。

V. 軽症の病型、超重症病型の患者への対応

タンデムマス対象疾患の中には、日本人患者の自然歴が十分に明らかになってない疾患もある。プロピオン酸血症は、欧米では、大部分が乳児期早期に重篤な症状で発症するため、マススクリーニングの効果が疑問視されている。これに対して、日本人のプロピオン酸血症では半数以上が軽症型

で、無症状で経過している。メチルクロトニルグリシン尿症は欧米では無症候性疾患とみなされているが、日本人患者では、目立った症状がなくても生化学検査異常を示したり、障害児の中に見つかったりする⁴⁾。現時点で無症候性であっても長期間みてゆくうちに何らかの症状が出てくる可能性は否定できない。

また有機酸・脂肪酸代謝異常の中には、ふだんは正常と変わらぬ生活をしているのに何らかのストレスを契機に急性症状をきたすことがある。あるいは、悪化するようなエピソードに“運よく”遭遇せず小児期を過ごし、生涯無症状で経過する患

者もありうる。

マススクリーニングで異常が発見された時、「ふだん正常と変わらぬ生活をできるが、何かのストレスが加わった時、生命にかかわるような発作を起こすかもしれません。しかし生涯無症状で過ごされる可能性もあります」という説明をした時、患者家族はどのように受け止めるであろうか。神経質な家族ならば、必要以上のストレスを感じながら生活するかもしれない。一方、楽天的な家族は長い間無症状で生活しているうちに「治療は不要である」と考えるようになり、忘れた頃に重篤な発作に遭遇するかもしれない。診療を担当する医師は注意深く説明する必要がある。

VI. 確定診断

新生児期に異常が発見された時、長期にわたって治療することになる。このため、必要に応じて確定診断は不可欠である。表2に示すように、アミノ酸代謝異常ではアミノ酸分析等で確認できることが多い。一方、有機酸・脂肪酸代謝異常症では、GC/MS分析、精密タンデムマス分析、酵素診断あるいは遺伝子診断がしばしば必要となる。しかし現状では、稀少疾患のために検査の頻度は低く特殊な検査と見なされている。このため保険診療になってない項目が多く、一部の研究機関のボランティアに頼っているところである。長い眼でみるとこの体制は不安定であり、継続的サービスが続けられるよう保険診療などによってサポートする必要がある。また精度の高い診断技術開発を進める環境が望まれる。

VII. 診療支援

タンデムマスで発見される疾患は稀少疾患であるが、いづどこで、どのような疾患が発見するかわからない。発見された時、紹介を受ける小児科医は必ずしも専門知識を持ち合わせているとは限らない。日本のどこで発見されても一定レベル以上の診療が受けられる環境作りが必要である。このため、診療ガイドブックを作成したり、あるいは診療現場で困った時コンサルタントできるような全国的ネットワークが作られるとよい⁹⁾。さらに小児科医のみならず、産科医療機関スタッフ、保健師、検査技術者などを対象とした啓発なども考えてゆくべきである。また特殊な治療薬、医療器具などを使いやすいように保険診療などによるサポートも必要である。

VIII. 費用対効果

新生児マススクリーニングを国民の税金による公的事業として行う以上、費用対効果を評価することは不可欠である。タンデムマスでは1回の検査で多種類の疾患が発見できるが、疾患によっては数年に1人しか見つからないものの早期発見治療が非常に効果的な疾患もある。表3に研究班でまとめたマススクリーニングの費用対効果を予防接種のそれと比較している。現時点では、低く見積もっても、予算の1.73～6.44倍の効果があると見積もられている。水痘、ムンプスのワクチンは4.5倍の効果があると計算されているが、ヒブ髄膜炎ワクチンについてはまだエビデンスは確定

表2. 確定診断のために必要な検査

	アミノ酸分析	有機酸分析 (GC/MS)	タンデムマス分析 (精密)	酵素測定・遺伝子解析	その他
アミノ酸代謝異常	◎	○	○	△	BH4負荷 プテリン分析
有機酸代謝異常症	○	◎	○	△～○	—
脂肪酸代謝異常症	△	○	○	○～◎	—

◎: 確定診断に必須である。○: 確定診断に参考になる。△: 原則として不要。

表3. タンデムマス・スクリーニングと予防接種の費用対効果分析

	増分便益費用比 (BCR)	増分純便益 (NET)
タンデムマス・スクリーニング	1.73~6.44	71~143億円
水痘ワクチン	4以上	522億円
ムンプスワクチン	5.2	379億円
ヒブ髄膜炎ワクチン	0.25~2.08	-332~477億円

平成22年度厚労科研報告書⁹⁾より抜粋

表4. タンデムマス検査実費試算の例

年間検査数	検査実費
50,000 /年	1,030円
30,000 /年	1,220円
10,000 /年	2,500円

平成21年度厚労省科学研究費報告書より抜粋。
 ※検査実費は、試薬、人件費または償却費等であり、
 家族への説明、検体採取、結果判定等にかかる経費
 は含まれていない。

していない。費用対効果解析は、出生率や疾患頻度、社会環境の変化などが変数となるため、継続して評価する必要がある⁹⁾。

IX. 検査施設の適正配置

タンデムマス機器の価格は現時点では約3千万円で、またその後の保守点検費用として年間約200万円必要であると予想される。スクリーニング検査用の機器としてはこれまでに比べ高価な機器である。またタンデムマス分析と結果判定に一定の熟練が必要であるが、1台の機器で年間5万検体以上を分析する能力がある。従って、1台の機器で多数検体を分析の方が効率的であり、また機器の精度管理の面からも有利である。表4に検査実費を試算した例を示している。

これまで自治体単位で新生児マススクリーニングが行われてきたが、少子化が進行した結果、自治体によって年間出生数が5千~9万とばらつきが大きくなっている。研究班は、タンデムマス導

入にあたって、1台のタンデムマスで少なくとも年間3万検体以上の検体を分析できるよう近隣の自治体と調整することを提言している⁹⁾。

X. 精度管理

マススクリーニングは、原則として「正常な新生児」を対象に行われる。それゆえ、一般の臨床検査と異なり見逃しは絶対に許されない。定期的に標準検体を用いて検査値が保証されるべきである。さらに日内変動、季節変動、施設間の変動を極力少なくすべきである。このためには、検体処理方法、分析条件などを標準化して、正常値を共有すべきである。

また検査値の精度管理のみならず、異常の発見された小児が適正に確定診断され、適切な診療を受けているか、マススクリーニングのアウトカムが良好なものかどうかについても精度管理が行われるべきである。

XI. 患者家族のQOLの向上

新生児マススクリーニングが始まった時、早期発見早期治療によって障害発生予防ができるということで患者家族は一生懸命食事療法を厳守し、障害から免れたことは事実である。しかし「食事療法」一つとっても患者家族にとって容易なことではない。育ち盛りの小児が、友達が食べるものを自分だけ我慢しなければならない。また定期的に病院に通い、そして検査を受け食事をより厳しく指導されることもある。時には食事の献立に途方にくれることもある。年が長ざると生命保険加

入が制限される事例があったり、不当な差別、いじめにあうこともある。これらは、実際に生活する患者家族からきいて初めてわかることであり、診療する側の教科書的な発想では忘れがちである。

患者家族との継続的な交流を通じて、生の声を聞き、研究の方向性に反映させることもでき、そして患者家族にとっては専門にしている医師との交流を通じて困っていることを相談でき、稀少疾患に関する新しい知見を知ることによって勇気付けられるかもしれない。結果的にはこれが治療効果の改善にも結びつく。今後マススクリーニングの効果を挙げるためには、患者家族との交流が非常に重要である。

XII. おわりに

2001年にマススクリーニング事業が国から自治体に委譲されて以来、日本の全体像が把握しにくくなり、新知見の普及、適切な指導が困難になっている面がある。患者家族は情報の少ない中で不安な生活をしているケースもある。担当する医師も情報不足の中で診療していて、診療が適切かどうか把握できない。

検体採取の産科機関、検査を担当する検査施設、診療を担当する小児科医、情報を把握し実践を担当する行政や保健師、および家族会などの継続的な連携によって、マススクリーニング事業の効果を最大限に発揮することができる。タンデムマスが1990年代に発明されて以来、欧米を中心に数年前から普及し、日本でも導入が目前となっている。タンデムマス導入はわが国の新生児マススクリーニング体制を立て直す好機である。

文 献

- 1) 山口清次：タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代。小児保健研究 65 (6) : 725-732, 2006
- 2) Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF: Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatr* 2003;111:1399-406.
- 3) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Sakura N, et al. Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. *J Chromat B* 2002;776:39-48.
- 4) Yorifuji, T, Kawai, M, Muroi J, Mamada M, Kurokawa K, Shigematsu Y, et al. Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications. *Hum Genet* 2002;111:161-5.
- 5) 北川照男, 松田一郎, 多田啓也, 大浦敏明, 大和田操, 青木菊磨, 山口清次, 高柳正樹, 重松陽介, 大浦敏博: タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報 42: 28-53, 2006
- 6) 山口清次: 厚生労働科学研究費補助金 (子ども家庭総合研究事業) 「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」 (研究代表者山口清次) 平成19-21年度総合研究報告書, 2010年